

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

C07H 21/00, 19/04

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/44345

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum:

27. November 1997 (27.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02257

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Mai 1997 (02.05.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 20 170.5

20. Mai 1996 (20.05.96)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: PFLEIDERER, Wolfgang  
[DE/DE]; Lindauer Strasse 47, D-78464 Konstanz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EISELE, Sigrid [DE/DE];  
Renkenweg 10, D-78464 Konstanz (DE).(74) Anwälte: HANSEN, Bernd usw.; Hoffmann - Eitle, Arabellas-  
trasse 4, D-81925 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, KR, MX,  
NO, PL, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.

(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES WITH PHOTO-UNSTABLE PROTECTIVE GROUPS

(54) Bezeichnung: NUCLEOSID-DERIVATE MIT PHOTOLABILEN SCHUTZGRUPPEN

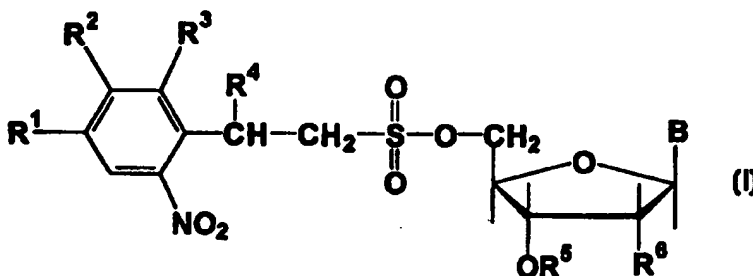
(57) Abstract

The invention relates to nucleoside derivatives with photo-unstable protective groups of the general formula (I) in which R<sup>1</sup> is H, NO<sub>2</sub>, CN, OCH<sub>3</sub>, halogen, alkyl or alkoxyalkyl with 1 to 4 C atoms, R<sup>2</sup> is H, OCH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> is H, F, Cl, Br, NO<sub>2</sub> or an aliphatic acyl radical with 2 to 5 C atoms, R<sup>4</sup> is H, halogen, OCH<sub>3</sub>, an alkyl radical with 1 to 4 C atoms or a possibly substituted aryl radical, R<sup>5</sup> is H or a conventional functional group for producing oligonucleotides, R<sup>6</sup> is H,

OH, halogen or XR<sup>8</sup>, where X is O or S and R<sup>8</sup> is a conventional protective group in nucleotide chemistry, B is adenine, cytosin, guanine, thymine, uracil, 2,6-diaminopurin-9-yl, hypoxanthin-9-yl, 5-methylcytosin-1-yl, 5-amino-4-imidazol carboxylic acid amid-1-yl or 5-amino-4-imidazol carboxylic acid amide-3-yl, where, if B is adenine, cytosin or guanine, the primary amino function may have a permanent protective group. These derivatives may be used for the light-controlled synthesis of oligonucleotides on a DNA chip.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I), in der R<sup>1</sup> = H, NO<sub>2</sub>, CN, OCH<sub>3</sub>, Halogen, Alkyl oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, R<sup>2</sup> = H, OCH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> = H, F, Cl, Br, NO<sub>2</sub> oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 C-Atomen, R<sup>4</sup> = H, Halogen, OCH<sub>3</sub>, ein Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest, R<sup>5</sup> = H oder eine übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonucleotiden, R<sup>6</sup> = H, OH, Halogen oder XR<sup>8</sup>, wobei X = O oder S und R<sup>8</sup> eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe darstellt, B = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-imidazolcarbonsäureamid-1-yl oder 5-Amino-4-imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von B = Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist. Diese Derivate können für die lichtgesteuerte Synthese von Oligonucleotiden auf einem DNA-Chip verwendet werden.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
ER	Äthiopien	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen

### Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen und Verfahren zu deren Herstellung.

Photolabile Schutzgruppen für die Hydroxy- und Phosphatfunktionen in Nucleosiden bzw. Nucleotiden sind von besonderem Interesse, da sie bspw. für lichtgesteuerte Parallel-Synthesen von Oligonucleotiden auf einem festen Träger geeignet sind (vgl. S.P.A. Fodor et al. Science 1991, 251, S. 767 ff). Mit ihrer Hilfe können sogenannte DNA-Chips (d. h. Trägerplättchen, auf deren Oberfläche viele verschiedene Oligonucleotide angeordnet sind) hergestellt werden, die wiederum in der Molekularbiologie für eine schnelle DNA-Sequenz-Analyse benötigt werden.

Entsprechend dem Stand der Technik wurden bisher als photolabile Schutzgruppen in der Nucleosid- bzw. Nucleotidchemie vor allem die o-Nitrobenzyl-Gruppe und ihre Derivate eingesetzt (vgl. V.N.R. Pillai, Org. Photochem. 1987, 2, S. 225 ff bzw. J.W. Walker et al., J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, S. 7170 ff). Als besonders nachteilig bei diesen Schutzgruppen hat sich die langsame und zum Teil nur unvollständige Entschützung der entsprechenden Nucleosid- bzw. Nucleotid-Derivate erwiesen. Außerdem entstehen bei der Abspaltung der o-Nitrobenzyl-Verbindungen z. T. unerwünschte Nebenprodukte in Form von toxischen Nitrosophenylverbindungen.

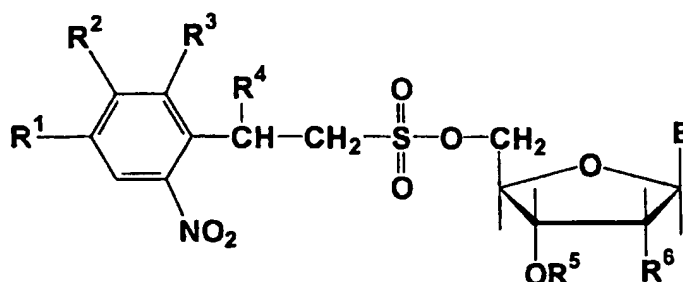
Als weitere photolabile Schutzgruppe für Nucleoside wurde entsprechend dem Artikel von W. Pfeleiderer et al. in "Biophosphates and Their Analogues-Synthesis, Structure, Metabolism and Activity", Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam) 1987, S. 133ff die 2-(o-Nitrophenyl)ethylgruppe empfohlen, die jedoch ausschließlich als Schutzgruppe im Basenteil, insbesondere in O<sup>6</sup>-Stellung des Guanosins, eingeführt wird. In derselben Publikation werden auch die p-Nitrophenylethoxycarbonyl (NPEOC)- und die 2,4-Dinitrophenylethoxycarbonyl (DNPEOC)-Gruppen sowohl als Schutzgruppen für die Aminofunktionen als auch für die

Hydroxylfunktionen im Zuckerteil beschrieben, doch erfolgt die Abspaltung dieser Gruppen ausschließlich durch basenkatalysierte  $\beta$ -Eliminierung.

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen für die 5'-OH-Funktion im Zuckerteil zu entwickeln, welche die genannten Nachteile entsprechend dem Stand der Technik nicht aufweisen, sondern sich vergleichsweise schnell, quantitativ und ohne Bildung unerwünschter Nebenprodukte entschützen lassen.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch Nucleosid-Derivate der allgemeinen Formel (I) entsprechend Anspruch 1 gelöst. Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß sich die erfindungsgemäßen Schutzgruppen wesentlich schneller und vollständiger abspalten lassen als z. B. die o-Nitrobenzylgruppen. Außerdem konnten bei der Entschützung bisher keine Nebenprodukte in größerem Umfang festgestellt werden, was ebenfalls nicht vorhersehbar war.

Die erfindungsgemäßen Nucleosid-Derivate weisen folgende allgemeine Formel (I) auf:



wobei die Reste  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  am Phenylring folgende Bedeutung haben können:

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{NO}_2, \text{CN}, \text{OCH}_3, \text{Halogen oder Alkyl oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen}$

$\text{R}^2 = \text{H}, \text{OCH}_3$

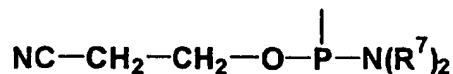
$R^3 = H, F, Cl, Br, NO_2$  oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 C-Atomen (wie z. B. Acetyl)

Der Rest  $R^4$ , der am  $C_2$ -Atom der o-Nitrophenylethyl-Gruppierung sitzt, kann entweder H, Halogen,  $OCH_3$ , ein Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest sein. Der Alkylrest kann hierbei linear oder verzweigt, substituiert (insbesondere mit einem oder mehreren Halogenatomen) oder unsubstituiert sowie gesättigt oder ungesättigt sein; das gleiche gilt auch für die Alkyl- und Alkoxyalkylreste bei  $R^1$ . Vorzugsweise stellt  $R^4$  einen Methylrest dar. Der Arylrest stellt vorzugsweise eine Phenylgruppe dar, die ggf. noch mit Alkyl- (mit 1 bis 4 C-Atomen), Alkoxy- (z. B. Methoxy) oder Dialkylamino-Gruppen (z. B. Dimethylamino) bzw. F, Cl, Br,  $NO_2$  oder CN substituiert sein kann. Im Falle von  $R^4 \neq H$  sind die Substituenten  $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^3$  am Phenylring vorzugsweise Wasserstoffreste.

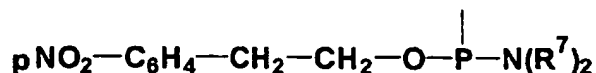
Halogen bedeutet in dieser Anmeldung durchwegs F, Cl, Br, I und vorzugsweise F, Cl oder Br.

Der Nucleosidteil der erfindungsgemäßen Verbindungen besteht aus den üblichen D-Ribofuranose- bzw. 2'-Desoxyribofuranose-Einheiten sowie den Pyrimidin- (B = Cytosin, Thymin, Uracil) bzw. Purinbasen (B = Adenin, Guanin). Als Basen können auch 2,6-Diaminopurin-9-yl-, Hypoxanthin-9-yl-, 5-Methylcytosin-1-yl-, 5-Amino-4-imidazolcarbonsäureamid-1-yl- oder 5-Amino-4-imidazolcarbonsäureamid-3-yl-Reste eingesetzt werden.

Die OH-Gruppe(n) im Ribofuranosid- bzw. 2'-Desoxyribofuranose-Teil können je nach Bedarf frei oder geschützt sein. Zum Schutz der 3'-Stellung haben sich hierbei die bekannten Phosphitamid-Gruppen bewährt, wie z. B.



oder

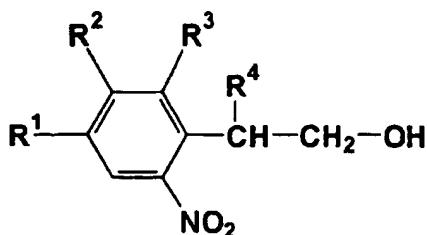


wobei die  $R^7$ -Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten. Vorzugsweise sind sie Ethyl- oder Isopropylreste.

In der 2'-Stellung des Ribofuranosid-Teiles (Position  $R^6$ ) kann neben dem Wasserstoff- oder Halogenatom (insbesondere F, Cl, Br) eine freie oder geschützte OH-Gruppe vorliegen, wobei eine beliebige in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe ( $R^8$ ) verwendet werden kann. Insbesondere kann auf die üblichen Alkyl-, Alkenyl-, Acetal- oder Silylether-Schutzgruppen für Sauerstoffatome ( $X = O$ ) zurückgegriffen werden.  $R^6$  kann auch eine S-Alkylgruppe darstellen ( $X = S$ ,  $R^8 = \text{Alkyl}$ ). Bevorzugte Beispiele für O-Alkyl-Schutzgruppen sind O-Methyl- oder O-Ethylreste, für O-Alkenyl-Schutzgruppen O-Allylreste, für O-Acetal-Schutzgruppen O-Tetrahydropyranyl- bzw. O-Methoxytetrahydropyranyl-Reste sowie für O-Silylether-Schutzgruppen O-t-Butyldimethylsilyl-Reste.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform können die Pyrimidin- bzw. Purinbasen mit primären Aminofunktionen (z. B. Adenin, Cytosin und Guanin) noch permanente Schutzgruppen vorzugsweise auf Carbonylbasis aufweisen). Bevorzugt sind hierbei vor allem Phenoxyacetyl- oder Dimethylformamidino-Reste, die für alle drei genannten Basen in Frage kommen. Daneben gibt es noch spezielle Schutzgruppen, die nur bei bestimmten Basen eingeführt werden. Dies sind bspw. im Falle von Adenin Benzoyl- oder p-Nitrophenylethoxycarbonyl (p-NPEOC)-Reste. Für Guanin können neben den p-NPEOC-Resten auch Isobutyroyl- oder p-Nitrophenylethyl- (p-NPE)-Schutzgruppen eingeführt werden. Schließlich eignen sich für Cytosin neben den p-NPEOC-Resten auch noch Benzoyl-Schutzgruppen.

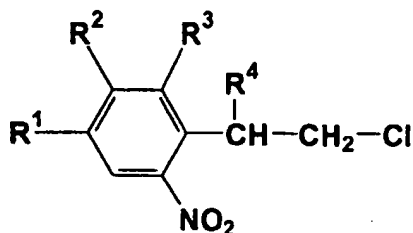
Die Herstellung der erfindungsgemäßen Nucleosid-Derivate kann in drei Stufen erfolgen. In der ersten Stufe a) wird ein Alkohol der allgemeinen Formel (II)



in der R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> die oben angegebene Bedeutung besitzen, mit Thionylchlorid vorzugsweise in einem unpolaren organischen Lösemittel bei Temperaturen zwischen 50 und 120 °C ggf. in Anwesenheit einer Base zur Umsetzung gebracht.

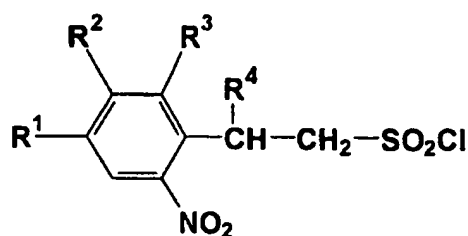
Die Alkoholkomponente ist in den meisten Fällen bekannt oder kann in analoger Weise nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Als unpolares organisches Lösemittel wird in Stufe a) vorzugsweise Toluol und als Base vorzugsweise Pyridin in einer Menge von 2 bis 10 Vol.-% bezogen auf das eingesetzte Toluol verwendet. Die Reaktionskomponenten können zwar in annähernd stöchiometrischem Verhältnis zur Umsetzung gebracht werden, doch wird das Thionylchlorid vorzugsweise in deutlichem Überschuß, bspw. in zwei- bis fünffachem molaren Überschuß, bezogen auf die Alkoholkomponente eingesetzt. Auch die Konzentration der Alkoholkomponente kann in weiten Grenzen variiert werden, doch hat es sich als besonders vorteilhaft erwiesen, diese Konzentration auf 1,0 bis 20,0 mmol pro 10 ml Solvens einzustellen.

Bei dieser Reaktion (Reaktionsdauer ca. 1 bis 3 Std.) entstehen in guter Reinheit und hoher Ausbeute (> 85 %) die entsprechenden Phenylalkylchloride der allgemeinen Formel (III)



Die Aufarbeitung der entsprechenden Produkte erfolgt vorzugsweise, indem man zunächst die Reaktionslösung mit Eiswasser und ggf. mehrmals mit Chloroform oder Dichlormethan behandelt, die organischen Phasen (bspw. mit Bicarbonat) neutralisiert, ggf. trocknet, das Lösemittel entfernt und anschließend das entsprechende Produkt ggf. durch Destillation oder Kristallisation aufreinigt.

In der anschließenden Reaktionsstufe b) werden die Phenylalkylchloride der allgemeinen Formel (III) zuerst mit Natriumthiosulfat zu den entsprechenden Estern und anschließend mit Chlor zu einem Phenylalkylsulfonylchlorid der allgemeinen Formel (IV)



umgesetzt. Die Umsetzung mit Natriumthiosulfat erfolgt vorzugsweise in einem Lösemittelgemisch bestehend aus einem Alkohol und Wasser bei Temperaturen zwischen 50 und 100 °C, wobei insbesondere ein Konzentrationsverhältnis von 10 bis 100 mmol Phenylalkylchlorid pro 10 ml Alkohol/Wasser-Gemisch eingestellt wird. Als Alkohole haben sich vor allem Methanol und Ethanol bestens bewährt. Das Mengenverhältnis von Alkohol zu Wasser kann in weiten Grenzen variiert werden, doch hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das Verhältnis von Alkohol zu Wasser auf annähernd 1 : 1 einzustellen.

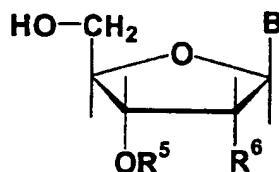
Das Molverhältnis von Phenylalkylchlorid zu Natriumthiosulfat sollte zumindest 1 : 1 betragen, doch wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform mit einem deutlichen Überschuß an Natriumthiosulfat gearbeitet, der insbesondere 1,5 bis 2,5 mmol pro mmol Phenylalkylchlorid beträgt. Nach Abschluß der Reaktion, die in der Regel nach 10 bis 20 Std. beendet ist, wird das Lösemittel nach den üblichen Methoden ganz oder weitgehend entfernt und die entsprechenden Ester ohne weitere Isolierung



oder Aufarbeitung mit Chlor zu den entsprechenden Phenylalkylsulfonylchloriden umgesetzt. Diese Chlorierung wird vorzugsweise in Wasser, einem Wasser/Essigsäure-Gemisch (bevorzugtes Mengenverhältnis 4 : 1 bis 2 : 1) oder einem Wasser/Dichlormethan-Gemisch (bevorzugtes Mengenverhältnis 2 : 1 bis 1:1) bei Temperaturen zwischen 0 und 10 °C durchgeführt, wobei mit einem großen Überschuß an Chlor gearbeitet werden kann. Vorzugsweise wird in dieser Stufe bei einer Konzentration von 5 bis 30 mmol Phenylalkylchlorid pro 100ml Solvens gearbeitet.

Nach der Chlorbehandlung (ca. 10 bis 30 Minuten) wird der Niederschlag abgetrennt und das Rohprodukt nach bekannten Methoden wie Kristallisation oder Säulenchromatographie aufgereinigt, wobei die entsprechenden Phenylalkylsulfonylchloride entweder als Feststoffe oder in Form von Ölen in sehr unterschiedlichen Ausbeuten anfallen.

Die Phenylalkylsulfonylchloride werden schließlich in der Reaktionsstufe c) mit den Nucleosiden der allgemeinen Formel (V)



umgesetzt, wobei  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$  und B die oben angegebene Bedeutung besitzen.

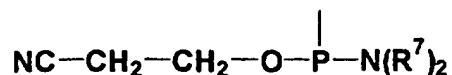
Diese Umsetzung erfolgt vorzugsweise in einem Lösemittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Pyridin bei Temperaturen zwischen -60 und 0 °C. Das Mischungsverhältnis von Dichlormethan zu Pyridin ist relativ unkritisch, doch werden vorzugsweise 1 bis 3 Vol.-teile Dichlormethan pro Vol.-teil Pyridin eingesetzt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das entsprechende Nucleosid (V), welches in Pyridin gelöst wurde, vorgelegt und eine Lösung des Phenylalkylsulfonylchlorids in Dichlormethan bei der jeweiligen

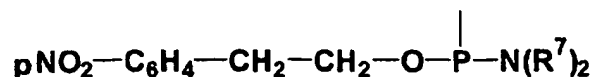
Reaktionstemperatur zugetropft. Das Molverhältnis von Nucleosid zu Phenylalkylsulfonylchlorid kann hierbei entsprechend der Stöchiometrie auf ca. 1 : 1 eingestellt werden. Vorzugsweise wird jedoch das Phenylalkylsulfonylchlorid im Überschuß eingesetzt, und zwar in einer solchen Menge, daß das Molverhältnis Nucleosid zu Phenylalkylsulfonylchlorid 1 : 1 bis 1 : 2 beträgt. Schließlich kann auch die Konzentration des Nucleosids im Lösemittelgemisch weitgehend variiert werden, doch wird es bevorzugt auf 0,1 bis 3,0 mmol pro 10 ml Solvens eingestellt.

Nach erfolgter Umsetzung (Reaktionszeit ca. 1 bis 10 Std.) können die erfindungsgemäßen Nucleosid-Derivate nach bekannten Methoden isoliert bzw. gereinigt werden, wie z. B. Verdünnen mit Dichlormethan, Auswaschen der Salze mit Wasser, Trocknen der organischen Phase, Einengen der Lösung bzw. Kristallisation und anschließende Säulenchromatographie. Auf diese Weise können die entsprechenden Nucleosid-Derivate mit hoher Reinheit und in guten Ausbeuten (30 bis 65 %) erhalten werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann man im Anschluß an die Reaktionsstufe b) in die 3'-Stellung der Nucleosid-Derivate mit  $R^5 = H$  die Phosphitamid-Gruppe



oder



nach bekannten Methoden einführen. Üblicherweise erfolgt diese Umsetzung mit den entsprechenden Phosphinen in Gegenwart von 1H-Tetrazol als Aktivator in einem Lösemittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Acetonitril bei Temperaturen zwischen 0 und 25 °C. Vorzugsweise wird das Phosphin in zwei- bis dreifachem molaren Überschuß eingesetzt, während das Molverhältnis Phosphin zu 1H-Tetrazol auf 3 : ca. 1,0 eingestellt wird. Das Mengenverhältnis von Dichlormethan zu Acetonitril ist relativ unkritisch und beträgt vorzugsweise 1 : 1 bis 4 : 1.

Nach erfolgter Umsetzung (ca. 10 bis 20 Std.) kann das entsprechende Nucleosid wie in Stufe c) beschrieben aufgearbeitet werden.

Wie Bestrahlungsversuche mit polychromatischem Licht mit Wellenlänge  $> 289\text{nm}$  belegen, lassen sich die erfindungsgemäßen Nucleoside sehr rasch ( $t_{0,5} = \text{ca. 1 bis 40 Minuten}$ ) und weitgehend entschützen (Ausbeuten bis zu 97%), so daß die besonderen Anforderungen an die Photolabilität der Schutzgruppen in hervorragender Weise erfüllt werden.

Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Nucleoside sehr gut für die Herstellung von Oligonucleotiden durch lichtgesteuerte Schutzgruppenabspaltung insbesondere auf festen Trägerplatten.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

### Beispiele

#### Allgemeines:

#### Lösemittel und Reagenzien

Lösemittel wurden destilliert oder nach den üblichen Methoden getrocknet. Für die Chromatographie wurden nur destillierte Lösungsmittel verwendet. Alle zu Synthesen verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität eingesetzt.

#### Chromatographie

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf Fertigfolien der Fa. Merck mit Fluoreszenzmarker (Kieselgel 60, F<sub>254</sub>) durchgeführt. Für die präparative Flash-Säulenchromatographie wurde Flash-Kieselgel der Fa. Baker verwendet. Es wurde mit einem Überdruck zwischen 0,25 bis 0,35 bar gearbeitet.

#### UV/VIS-Absorptionsspektren

Die UV-Spektren wurden in Methanol (Uvasol, der Fa. Merck) mit einem Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer, Modell Lambda 5, gemessen. Bei den Synthesevorschriften sind jeweils  $\lambda$  [nm] und ( $\lg \epsilon$ ) angegeben. Schultern wurden in [ ]-Klammern gesetzt.

### $^1\text{H}$ -NMR-Spektren

Zur Aufnahme der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren diente ein 250 MHz-FT-Spektrometer, Modell AC 250, der Fa. Bruker. Die Spektren wurden auf das Protonensignal des Lösungsmittels ( $\text{CDCl}_3$ : 7,24,  $\text{D}_6$ -DMSO: 2,49) geeicht.

### Abkürzungen

LM = Lösemittel

EE = Essigsäureethylester

PE = Petrolether

TOL = Toluol

NPE = 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-

NPES = 2-(2-Nitrophenyl)ethylsulfonyl-

NPSP = 2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonyl-

### Herstellung der Phenylalkylchloride

#### Beispiel 1

#### 2-(2-Nitrophenyl)ethylchlorid

Zu 10,13 g 2-(2-Nitrophenyl)ethanol (60 mmol) in 36 ml abs. Toluol gibt man 2,1 ml abs. Pyridin und 21,62 g Thionylchlorid (13,3 ml, 0,18 mol). Nach 2 h am Rückfluß läßt man abkühlen und gießt auf Eis. Das Eiswasser wird mit 50 ml Chloroform versetzt und noch 2 x mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen neutralisiert man noch 2 x mit je 100 ml gesättigter Bicarbonat-Lösung. Nach dem Trocknen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird abfiltriert und einrotiert. Nach Destillation im Hochvakuum erhält man 9,7 g (50 mmol, 87%) 2-(2-Nitrophenyl)ethylchlorid mit einem Siedepunkt von 66 bis 67 °C (0,001 mbar) als gelbes Öl.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,39$  (PE/EE 9:1)

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

8,00 (dd, 1H, arom. H, o zu  $\text{NO}_2$ ), 7,59 (t, 1H, arom. H), 7,45 (m, 2H, arom. H), 3,85 (t, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 3,38 (t, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ )

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] ( $\lg \epsilon$ ):

204 (4,06), [216 (3,78)], 256 (3,69)

### Beispiel 2

#### 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylchlorid

Zu 8,8 g 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethanol (44 mmol) in 100 ml abs. Toluol tropft man 15,60 g Thionylchlorid (130 mmol) in 10 ml Toluol (abs.) schnell zu. Die Reaktionslösung wird 1 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird auf Eis gegossen, mit 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt und die H<sub>2</sub>O-Phase noch 2 x mit je 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen trocknet man über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und rotiert ein. Man erhält 9,08 g (41 mmol, 94 %) 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylchlorid als braunes Öl, das nach mehrtägiger Lagerung im Kühlschrank kristallisiert.

DC (Kieselgel): R<sub>f</sub> = 0,71 (PE/EE 7:3)

Schmp.: < 25 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

7,76 (dd, 1H, arom. H), 7,66 (dd, 1H, arom. H), 7,38 (t, 1H, arom. H, m zu NO<sub>2</sub>), 3,80 (m, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 3,44 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>)

UV (MeOH), λ [nm] (lg ε):

212 (3,78), 252 (3,55), [286 (3,15)]

Elementaranalyse: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (220,1 g/mol)

	C	H	N
ber.	43,66	3,21	6,36
gef.	43,95	3,35	6,31

### Beispiel 3

#### 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylchlorid

Zu einer Lösung von 6,78 g 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethanol (33 mmol) in 100 ml abs. Toluol und 2,5 ml Pyridin tropft man schnell 12 g Thionylchlorid (7,4 ml, 100 mmol) in 10 ml Toluol (abs.). Man erhitzt 2 h am Rückfluß, läßt abkühlen, gießt auf 100 g Eis und versetzt mit 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Die wäßrige Phase wird noch 2 x mit je 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2 x mit je 80 ml gesättigter Bicarbonat-Lösung neutralisiert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Man erhält 7,12 g (32 mmol, 98 %) 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylchlorid als braunes Öl, das nach einigen Tagen im Kühlschrank zu einem braunen Feststoff erstarrt.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,54$  (PE/EE 9:1)

Schmp.:  $< 25^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

8,01 (d, 1H,  $\text{H}_a$ ), 7,57 (dd, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7,41 (d, 1H,  $\text{H}_c$ ), 3,83 (t, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 3,35 (t, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ )

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] ( $\lg \epsilon$ ):

214 (4,27), 254 (3,65), 293 (3,48)

Elementaranalyse:  $\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_2$  (220,1 g/mol)

	C	H	N
ber.	43,67	3,21	6,37
gef.	43,72	3,14	6,15

#### Beispiel 4

##### 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylchlorid

20 g 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethanol (94 mmol) werden in 120 ml abs. Toluol und 4 ml Pyridin gelöst. Man tropft schnell 34 g Thionylchlorid (21 ml, 282 mmol) in 20 ml Toluol, abs. zu. Nach 2 h am Rückfluß läßt man abkühlen und gießt auf Eis. Man versetzt mit 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und extrahiert die

wäßrige Phase noch 2 x mit je 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Man erhält 21,51 g (93 mmol, 98 %) 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylchlorid als braunes Öl.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,62$  (PE/EE 7:3)

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

8,87 (d, 1H,  $\text{H}_a$ ), 8,44 (dd, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7,71 (d, 1H,  $\text{H}_c$ ), 3,90 (t, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 3,50 (t, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ )

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] ( $\lg \epsilon$ ):

211 (4,43), 266 (4,22), [273 (4,16)]

#### Beispiel 5

##### 2-(2-Nitrophenyl)propylchlorid

Zu 6,2 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (34 mmol) in 90 ml abs. Toluol und 2 ml Pyridin tropft man 12,16 g Thionylchlorid (7,5 ml, 102 mmol) in 10 ml Toluol (abs.) schnell zu. Die Reaktionslösung wird 1 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird auf 100 g Eis gegossen und mit 80 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  versetzt. Die  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase extrahiert man noch 2 x mit je 80 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Die vereinigten organischen Phasen werden mit 120 ml gesättigter Bicarbonat-Lösung neutralisiert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und einrotiert. Man erhält 6,62 g (33 mmol, 98 %) 2-(2-Nitrophenyl)propylchlorid als braunes Öl.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,75$  (PE/EE 7:3)

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

7,80 (dd, 1H, arom. H, o zu  $\text{NO}_2$ ), 7,60 (m, 1H, arom. H), 7,44 (m, 2H, arom. H), 3,74 (m, 3H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ,  $\beta\text{-CH}$ ), 1,46 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ )

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] ( $\lg \epsilon$ ):

206 (3,79), [217 (4,05)], 251 (3,60)

Elementaranalyse:  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$  (199,6 g/mol)

	C	H	N
ber.	54,15	5,05	7,02
gef.	54,24	5,01	7,06

### Herstellung der Phenylalkylsulfonylchloride

#### Beispiel 6

##### 2-(2-Nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid

3,7 g 2-(2-Nitrophenyl)ethylchlorid (20 mmol) werden mit 7,8 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat (31 mmol) in 95 ml 50 %igem wäßrigem Methanol gelöst und 16 h am Rückfluß erhitzt. Man filtriert die Lösung nach dem Abkühlen und rotiert ein bis Niederschlag ausfällt. Es wird in einen 500ml Dreihalskolben umgefüllt, auf 10 °C abgekühlt und mit 100 g Eis versetzt. Man leitet 10 Min. einen starken Chlorstrom durch die Lösung. Die Temperatur sollte dabei nicht über 10 °C steigen. Es wird noch 1/2 h bei Raumtemperatur gerührt, so daß überschüssiges Chlor entweichen kann. Man saugt den Niederschlag über eine Glasfritte ab und trocknet ihn im Exsikkator. Zur Reinigung wird der Niederschlag in Chloroform gelöst und mit wenig Petrolether ausgefällt. Man erhält 3,2 g (13 mmol, 65 %) 2-(2-Nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid als beige Kristalle.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,65$  (PE/EE 7:3)

Schmp.: 76 bis 77 °C (Lit.: 74 bis 75 °C)

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

8,09 (dd, 1H, arom. H, o zu  $\text{NO}_2$ ), 7,69 (t, 1H, arom. H), 7,55 (m, 2H, arom. H), 4,10 (t, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 3,62 (t, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ )

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] ( $\lg \epsilon$ ):

203 (4,00), 214 (3,75), 257 (3,62)



Beispiel 7

## 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid

1,3 g 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylchlorid (6 mmol) und 3,7 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat (15 mmol) werden in 50 ml Ethanol/Wasser (1:1) 3 Tage am Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wird heiß filtriert und bis zur Trockene einrotiert. Man löst den Rückstand in H<sub>2</sub>O und extrahiert 2 x mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, um nicht umgesetztes Edukt zu entfernen. In die auf 3 °C gekühlte Wasserphase wird Chlor eingeleitet. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Temperatur nicht über 10 °C steigt. Man rührt noch 30 Min., damit überschüssiges Chlor entweichen kann. Der Niederschlag wird abgesaugt (geht äußerst schlecht, da es eine zähe, klebrige Masse ist). Reinigung über Flash-Chromatographie, das Rohprodukt wird in wenig CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst auf die Säule aufgetragen, da es sich in Petrolether nicht vollständig löst (36 g Kieselgel, 3 x 10 cm, LM: PE/EE, kond. 9:1, Gradient: 200 ml PE/EE 9:1, 80 ml 7:1, 140 ml 6:1, 120 ml 5:1, 100 ml 4:1). Man erhält 400 mg (1,5 mmol, 25 %) 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid als gelblichen Feststoff.

DC (Kieselgel): R<sub>f</sub> = 0,19 (PE/EE 9:1)

Schmp.: 75 bis 76 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

7,88 (dd, 1H, arom. H), 7,74 (dd, 1H, arom. H), 7,51 (t, 1H, arom. H, m zu NO<sub>2</sub>), 4,08 (t, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 3,63 (t, 2H, β-CH<sub>2</sub>)

UV (MeOH), λ [nm] (lg ε):

210 (4,23), 255 (3,61), 269 (3,44)

Elementaranalyse: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>S (268,1 g/mol)

	C	H	N
ber.	33,82	2,48	4,93
gef.	34,11	2,50	5,10

Beispiel 8

## 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid

5,02 g 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylchlorid (22 mmol) und 8,89 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat (36 mmol) werden in 80 ml 50 %igem wäßrigem Methanol gelöst und 15 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen filtriert man ab und rotiert die Lösung auf 50 ml ein. Man füllt in einen 500 ml Dreihalskolben um und kühlt auf 10 °C ab, versetzt mit 25 ml Eisessig und 100g Eis. Nach 10 Min. Einleiten von Chlorgas (die Temperatur soll nicht über 10 °C steigen) wird noch 1/2 h bei Raumtemperatur gerührt, um überschüssiges Chlor entweichen zu lassen. Der entstandene zähe, klebrige Niederschlag wird abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und über Nacht im Exsikkator über NaOH getrocknet. Die restliche Substanz im Kolben wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert. Der getrocknete Niederschlag wird ebenfalls in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen, mit dem anderen Niederschlag vereinigt und einrotiert. Das Rohprodukt (5,636 g) wird auf Kieselgel aufgezogen und über Flash-Chromatographie gereinigt (150 g Kieselgel, 5 x 11 cm, LM: PE/EE, kond. 15:1, Gradient: 250 ml 15:1, 330 ml 10:1, 340 ml 7,5:1, 360 ml 5:1). Man erhält 3,38 g (12 mmol, 55 %) 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid als gelben Feststoff.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,65$  (PE/EE 7:3)

Schmp.: 59 bis 61 °C

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

8,11 (d, 1H, H<sub>a</sub>), 7,63 (dd, 1H, H<sub>b</sub>), 7,46 (d, 1H, H<sub>c</sub>), 4,07 (t, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 3,59 (t, 2H, β-CH<sub>2</sub>)

UV (MeOH), λ [nm] (lg ε):

214 (4,26), 255 (3,60), 300 (3,11)

Elementaranalyse: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>S (284,1 g/mol)

	C	H	N
ber.	33,82	2,48	4,93
gef.	34,25	2,47	4,97

Beispiel 9

## 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylsulfonylchlorid

9,22 g 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylchlorid (40 mmol) und 14,89 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat (60 mmol) werden in 180 ml 50 %igem wäßrigem Methanol gelöst und 16 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen filtriert man ab und rotiert die Lösung auf die Hälfte des Volumens ein. Man füllt in einen 500 ml Dreihalskolben um, kühlt auf 10 °C ab und versetzt die Lösung mit 50 ml Eisessig und 150 g Eis. Nach 10 Min. Einleiten von Chlorgas (die Temperatur soll nicht über 10 °C steigen) wird noch 1/2 h bei Raumtemperatur gerührt, um überschüssiges Chlor entweichen zu lassen. Der entstandene zähe, klebrige Niederschlag wird abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen. Die restliche Substanz im Kolben wird ebenso wie der abgesaugte Niederschlag in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und einrotiert. Man erhält 7,34 g braunes Öl (25 mmol, 62 %), das noch verunreinigt ist. Zur weiteren Reinigung wird jeweils die Hälfte des Rohproduktes auf Kieselgel aufgezogen und über Flash-Chromatographie (70 g Kieselgel, 4 x 11 cm, LM: PE/EE, kond.: 15:1, Gradient: 200 ml 15:1, 330 ml 10:1, 340 ml 7,5:1, 350 ml 6:1, 360 ml 5:1) gereinigt. Man erhält insgesamt 4,37 g (15 mmol, 37 %) 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylsulfonylchlorid als gelben Feststoff.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,42$  (PE/EE 7:3)

Schmp.: 79 bis 80 °C

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

8,96 (d, 1H,  $\text{H}_a$ ), 8,50 (dd, 1H,  $\text{H}_b$ ), 7,78 (d, 1H,  $\text{H}_c$ ), 4,12 (t, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$ ), 3,73 (t, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$ )

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] (lg  $\epsilon$ ):

239 (4,21), [255 (4,12)]

Elementaranalyse:  $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_6\text{S}$  (294,7 g/mol)

	C	H	N
ber.	32,61	2,39	9,51
gef.	32,80	2,31	9,15

Beispiel 10

## 2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonylchlorid

2 g 2-(2-Nitrophenyl)propylchlorid (10 mmol) und 3,75 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat (15 mmol) werden in 50 ml 50 %igem wässrigem Methanol gelöst und 15 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen filtriert man ab und rotiert die Lösung bis zum Öl ein. Das Öl wird in einen 250 ml Dreihalskolben umgefüllt, auf 10 °C abgekühlt, mit 50 ml H<sub>2</sub>O, 25 ml Eisessig und 50 g Eis versetzt. Nach 10 Min. Einleiten von Chlorgas (die Temperatur soll nicht über 10 °C steigen) wird noch 1/2 h bei Raumtemperatur gerührt, um überschüssiges Chlor entweichen zu lassen. Man extrahiert die Reaktionslösung 1 x mit 200 ml und 2 x mit je 75 ml Ether. Die vereinigten Etherphasen werden mit je 100 ml 5 %iger Natriumbisulfit-Lösung und H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert. Das Rohprodukt (1,03 g) wird auf Kieselgel aufgezogen und über Flash-Chromatographie gereinigt (34g Kieselgel, 3 x 10 cm, LM: PE/EE, kond. 15:1, Gradient: 250 ml 15:1, 165 ml 10:1, 170 ml 7,5:1, 180 ml 5:1). Man erhält 458 mg Edukt 2-(2-Nitrophenyl)propylchlorid und 423 mg (1,6 mmol, 16 %) 2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonylchlorid als rötliches Öl.

DC (Kieselgel) R<sub>f</sub> = 0,51 (PE/EE 7:3)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

7,91 (dd, 1H, arom. H, o zu NO<sub>2</sub>), 7,74 (m, 1H, arom. H), 7,47 (m, 2H, arom. H), 4,19 (m, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 3,96 (m, 1H, β-CH), 1,63 (d, 3H, CH<sub>3</sub>)

UV (MeOH), λ[nm] (lg ε):

204 (4,15), [216 (3,94)], 252 (3,64)

Elementaranalyse: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>S (263,7 g/mol)

	C	H	N
ber.	40,99	3,82	5,31
gef.	41,40	3,77	5,08

### Herstellung der Nucleosid-Derivate

#### Beispiel 11

#### N<sup>6</sup>-NPEOC-5'-O-[2-(2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-2'-desoxyadenosin

Zu 438 mg N<sup>6</sup>-NPEOC-2'-desoxyadenosin (1 mmol, 3 x mit je 4 ml abs. Pyridin koevaporiert) in 3,5 ml abs. Pyridin wird bei -45 °C 304 mg 2-(2-Nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid (1,2 mmol) in 3,5 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> innerhalb von 20 Min. zugetropft. Nach 4 h Rühren bei -40 bis -20 °C erhöht man die Temperatur 2 h auf -15 bis -5 °C und läßt sie dann noch 1 1/2 h ansteigen, bis 0 °C erreicht sind. Nach insgesamt 7 1/2 h wird die Lösung mit 15 ml H<sub>2</sub>O und 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt. Man extrahiert die H<sub>2</sub>O-Phase noch 2 x mit je 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und trocknet die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Man filtriert ab, rotiert ein und koevaporiert 3 x mit Toluol und 1 x mit MeOH. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (37 g Kieselgel, 4 x 10 cm, LM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, kond.: 100:1, Gradient: 80 ml 100:1, je 100 ml 100:2, 100:3, 100:4 und 100:5) gereinigt. Man erhält 174 mg (0,2 mmol, 20 %) N<sup>6</sup>-NPEOC-3',5'-di-O-[2-(2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-2'-desoxyadenosin und 219 mg (0,35 mmol, 35 %) N<sup>6</sup>-NPEOC-5'-O-[2-(2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-2'-desoxyadenosin als farblose Schäume.

DC (Kieselgel): R<sub>f</sub> = 0,33 (Tol/EE/MeOH 5:4:1)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):

10,57 (s, 1H, NH), 8,59 (2 x s, 2H, H-C(8), H-C(2)), 8,15 (d, 2H, arom. H NPEOC, o zu NO<sub>2</sub>), 7,96 (d, 1H, arom. H NPES, o zu NO<sub>2</sub>), 7,61 (d, 2H, arom. H NPEOC, m zu NO<sub>2</sub>), 7,47 (m, 3H, arom. H NPES), 6,48 (t, 1H, H-C(1')), 5,62 (d, 1H, OH-C(3')), 4,44 (m, 5H, H-C(3'), 2 x α-CH<sub>2</sub> NPE), 4,10 (m, 1H, H-C(4')), 3,62 (m, 2H, H-C(5')), 3,14 (m, 4H, 2 x β-CH<sub>2</sub> NPE), 2,87 (m, 1H, H-C(2')), 2,38 (m, 1H, H-C(2'))

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] (lg  $\epsilon$ ):

206 (4,56), 266 (4,46), 274 [(4,39)]

Elementaranalyse:  $C_{27}H_{27}N_7O_{11}S \times 1/2 H_2O$  (666,6 g/mol)

	C	H	N
ber.	48,64	4,23	14,71
gef.	48,63	4,11	14,31

### Beispiel 12

5'-O-[2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N<sup>6</sup>-NPEOC-2'-desoxyadenosin

Zu 355 mg N<sup>6</sup>-NPEOC-2'-desoxyadenosin (0,8 mmol, 3 x mit je 4 ml abs. Pyridin koevaporiert) in 4 ml abs. Pyridin wird bei -45 °C 290 mg 2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid (1,02 mmol) in 4 ml abs.  $CH_2Cl_2$  innerhalb von 20 Min. zugetropft. Nach 4 h Rühren bei -40 bis -30 °C läßt man die Temperatur 2 1/2 h ansteigen, bis 0 °C erreicht sind. Nach insgesamt 6 1/2 h wird die Lösung mit 15 ml  $H_2O$  und 15 ml  $CH_2Cl_2$  versetzt und die  $H_2O$ -Phase noch 3 x mit je 15 ml  $CH_2Cl_2$  extrahiert. Man trocknet die vereinigten organischen Phasen über  $Na_2SO_4$ , filtriert ab, rotiert ein und koevaporiert 3 x mit Toluol und 1 x mit MeOH. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (32 g Kieselgel, 3 x 10 cm, LM:  $CH_2Cl_2/MeOH$ , kond.: 100:1, Gradient: 100 ml 100:1, je 100 ml 100:2, 100:3, 100:4 und 100:5) gereinigt. Man erhält 214 mg (0,3 mmol, 39 %) 5'-O-[2-(2-Chlor-6-nitrophenyl) -ethylsulfonyl]-N<sup>6</sup>-NPEOC-2'-desoxyadenosin als farblosen Schaum.

DC (Kieselgel):  $R_f = 0,36$  (Tol/EE/MeOH 5:4:1)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz,  $D_6$ -DMSO):

10,56 (s, 1H, NH), 8,58 (s, 2H, H-C(8), H-C(2)), 8,15 (d, 2H, arom. H NPEOC, o zu  $NO_2$ ), 7,94 (d, 1H, arom. H NPES), 7,81 (d, 1H, arom. H NPES), 7,56 (d, 3H, 2 arom. H NPEOC, m zu  $NO_2$ , 1 arom. H NPES, m zu  $NO_2$ ), 6,47 (t, 1H, H-C(1')), 5,62 (d, 1H, OH-C(3')), 4,46 (m, 5H, H-C(3')), 2 x  $\alpha$ - $CH_2$  NPE), 4,12 (m, 1H, H-C(4')), 3,52 (m, 2H, H-C(5')), 3,21 (m, 2H,  $\beta$ -

CH<sub>2</sub> NPE), 3,10 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub> NPE), 2,88 (m, 1H, H-C(2')), 2,38 (m, 1H, H-C(2'))

UV (MeOH), λ [nm] (lg ε):

210 (4,62), 266 (4,43), [272 (4,39)]

Elementaranalyse: C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S x 1/2 H<sub>2</sub>O (701,1 g/mol)

	C	H	N
ber.	46,25	3,74	13,98
gef.	46,33	3,79	13,48

### Beispiel 13

5'-O-[2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N<sup>4</sup>-NPEOC-2'-desoxycytidin

Zu 250 mg N<sup>4</sup>-NPEOC-2'-desoxycytidin (0,59 mmol, 3 x mit je 4 ml abs. Pyridin koevaporiert) in 2,5 ml abs. Pyridin tropft man bei 0 °C innerhalb von 45 Min. 253 mg 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonylchlorid (0,89 mmol) in 2,5 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zu. Nach 3 3/4 h Rühren bei 0 °C wird die Lösung mit 10 ml H<sub>2</sub>O und 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt. Man extrahiert die H<sub>2</sub>O-Phase noch 1 x mit 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert, einrotiert und 3 x mit Toluol und 2 x mit MeOH koevaporiert. Das erhaltene Rohprodukt (942 mg) wird durch Flash-Chromatographie (37 g Kieselgel), 3 x 10 cm, LM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, kond.: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Gradient: 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, je 200 ml 100:1, 100:2, 100:3 und 100 ml 100:4) gereinigt. Man erhält 214 mg (0,32 mmol, 34 %) 5'-O-[2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N<sup>4</sup>-NPEOC-2'-desoxycytidin als farblosen Schaum. Die erhaltenen Mischfraktionen werden noch einmal chromatographiert (5 g Kieselgel, 1 x 12 cm, LM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, kond.: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Gradient: 70 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, je 100 ml 100:5, 100:1 und 50 ml 100:2). Man erhält 147 ml (0,16 mmol, 27 %) 3'-O-[2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N<sup>4</sup>-NPEOC-2'-desoxycytidin und 24 mg (0,04 mmol, 6 %) 3',5'-Di-O-[2-(4-chlor-2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N<sup>4</sup>-NPEOC-2'-desoxycytidin ebenfalls als farblose Schäume.

DC (Kieselgel): R<sub>f</sub> = 0,43 (Tol/EE/MeOH 5:4:1)

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}^6\text{-DMSO}$ ):

10,78 (s, 1H, NH), 8,15 (d, 2H, arom. H NPEOC, o zu  $\text{NO}_2$ ), 8,08 (d, 1H,  $\text{H}_\text{a}$ ), 8,01 (d, 1H, H-C(6)), 7,75 (dd, 1H,  $\text{H}_\text{b}$ ), 7,59 (d, 3H, 2 arom. H NPEOC, m zu  $\text{NO}_2$ ,  $\text{H}_\text{c}$ ), 6,94 (d, 1H, H-C(5)), 6,14 (t, 1H, H-C(1')), 5,52 (d, 1H, OH-C(3')), 4,43 (d, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$  NPE), 4,34 (t, 2H,  $\alpha\text{-CH}_2$  NPE), 4,21 (m, 1H, H-C(3')), 4,03 (m, 1H, H-C(4')), 3,73 (m, 2H, H-C(5')), 3,25 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$  NPE), 3,07 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}_2$  NPE), 2,27 (m, 1H, H-C(2')), 2,12 (m, 1H, H-C(2'))

UV (MeOH),  $\lambda$  [nm] (lg  $\epsilon$ ):

[207 (4,61)], 212 (4,65), 244 (4,36), [269 (4,28)]

Elementaranalyse:  $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_{12}\text{S}$  (668,0 g/mol)

	C	H	N
ber.	46,75	3,92	10,48
gef.	46,82	3,97	10,16

#### Beispiel 14

5'-O-[2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylsulfonyl]- $\text{N}^2$ -NPEOC-O $^6$ -NPE-2'-desoxyguanosin

Zu 391 mg  $\text{N}^2$ -NPEOC-O $^6$ -NPE-2'-desoxyguanosin (0,65 mmol, 3 x mit je 8 ml abs. Pyridin koevaporiert) in 3 ml abs. Pyridin wird bei  $-50^\circ\text{C}$  381 mg 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylsulfonylchlorid (1,3 mmol) in 3 ml abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  innerhalb von 40 Min. zugetropft. Nach 4 h Rühren bei  $-50$  bis  $-30^\circ\text{C}$  und 2 1/2h bei  $-30$  bis  $-15^\circ\text{C}$  versetzt man die Lösung mit 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 15 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Die  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase wird noch 1 x mit 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Man filtriert ab, rotiert ein und koevaporiert 3 x mit Toluol und 1 x mit MeOH. Das erhaltene Rohprodukt (730 mg) wird durch Flash-Chromatographie (33 g Kieselgel, 3 x 9 cm, LM:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , kond.:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Gradient: 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , je 200 ml 100:0,7, 100:1,4, 100:2, 100:3 und 100:4) gereinigt. Man erhält 141 mg (0,12 mmol, 19 %) noch leicht verunreinigtes 3',5'-Di-O-[2-(2,4-dinitrophenyl)ethylsulfonyl]- $\text{N}^2$ -NPEOC-O $^6$ -NPE-2'-desoxyguanosin und



339 mg (0,39 mmol, 60 %) 5'-O-[2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylsulfonyl]-N<sup>2</sup>-NPEOC-O<sup>6</sup>-NPE-2'-desoxy- guanosin als leicht gelbliche Schäume.

DC (Kieselgel): R<sub>f</sub> = 0,46 (Tol/EE/MeOH 5:4:1)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):

10,31 (s, 1H, NH), 8,64 (d, 1H, H<sub>a</sub>), 8,34 (dd, 1H, H<sub>b</sub>), 8,29 (s, 1H, H-C(8)), 8,15 (d, 4H, arom. H NPE, o zu NO<sub>2</sub>), 7,62 (d, 4H, arom. H NPE, m zu NO<sub>2</sub>), 7,57 (s, 1H, H<sub>c</sub>), 6,33 (t, 1H, H-C(1')), 5,53 (d, 1H, OH-C(3')), 4,68 (t, 2H, α-CH<sub>2</sub> NPE), 4,48 (m, 3H, α-CH<sub>2</sub> NPE, H-C(3')), 4,33 (t, 2H, α-CH<sub>2</sub> NPE), 4,06 (m, 1H, H-C(4')), 3,66 (m, 2H, H-C(5')), 3,24 (m, 4H, 2 x β-CH<sub>2</sub> NPE), 3,08 (t, 2H, β-CH<sub>2</sub> NPE), 2,89 (m, 1H, H-C(2')), 2,26 (m, 1H, H-C(2'))

UV (MeOH), λ [nm] (lg ε):

[206 (4,70)], 214 (4,74), [254 (4,60)], 265 (4,63)

Elementaranalyse: C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub>S x 1/2 H<sub>2</sub>O (876,8 g/mol)

	C	H	N
ber.	47,94	3,79	14,37
gef.	48,27	3,65	14,00

#### Beispiel 15

5'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonyl]-thymidin

242 mg Thymidin (1 mmol, 3 x mit je 5 ml abs. Pyridin koevaporiert) werden in 2,5 ml abs. Pyridin gelöst und auf -60 °C gekühlt. Dazu tropft man innerhalb von 10 Min. 396 mg 2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonylchlorid (1,5 mmol) in 2,5 ml abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Nach 4 h Rühren bei einer Temperatur zwischen -60 und -30°C läßt man die Temperatur auf -15 °C ansteigen. Die Reaktion wird nach insgesamt 6 1/4 h mit je 15 ml H<sub>2</sub>O und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und die wäßrige Phase noch 4 x mit je 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Man koevaporiert noch 3 x mit Toluol und 1 x mit Methanol. Das Rohprodukt (600 mg) wird über Flash-Chromatographie (39 g Kieselgel, 3 x 11 cm, LM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, kond.: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Gradient: 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,

je 150 ml 100:1, 100:2, 100:3 und 100:4) gereinigt. Man erhält 290 mg (0,62 mmol, 62 %) 5'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propyl-sulfonyl]-thymidin als farblosen Schaum. Die erhaltenen Mischfraktionen werden durch eine weitere Säule (4,5 g Kieselgel, 1 x 11 cm, LM: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, kond.: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Gradient: 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, je 50 ml 100:0,5, 100:1 und 100:2) gereinigt. Es werden 128 mg (0,18 mmol, 18 %) 3',5'-Di-O-[2-(2-nitrophenyl)propylsulfonyl]-thymidin als farbloser Schaum und 26 mg (0,06 mmol, 6 %) 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonyl]-thymidin als leicht rötlicher Schaum isoliert.

DC (Kieselgel): R<sub>f</sub> = 0,39 (Tol/EE/MeOH 5:4:1)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>6</sub>-DMSO):

11,32 (d, 1H, NH), 7,84 bis 7,64 (m, 3H, arom. H NPPS), 7,44 (m, 2H, 1 arom. H NPPS, H-C(6)), 6,16 (q, 1H, H-C(1')), 5,45 (q, 1H, OH-C(3')), 4,32 bis 4,19 (m, 2H, H-C(5')), 4,06 (m, 1H, H-C(3')), 3,84 (d, 3H, a-CH<sub>2</sub> NPPS, H-C(4')), 3,71 (m, 1H, β-CH NPPS), 2,09 (m, 2H, H-C(2')), 1,73 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Thymidin), 1,38 (dd, 3H, CH<sub>3</sub> NPPS)

UV (MeOH), λ [nm] (lg ε):

205 (4,28), [217 (4,08)], 262 (4,07)

Elementaranalyse (Mol. Gew.): C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S (469,5 g/mol)

	C	H	N
ber.	48,61	4,94	8,95
gef.	48,69	4,95	8,71

### Bestrahlungsexperimente

#### 1. Durchführung

Die entsprechend geschützten Nucleosid-Derivate wurden mit Hilfe einer Apparatur bestrahlt, die aus einer Hg-Höchstdrucklampe (200 W), einem IR-Filter (Wasser), einem Shutter (automatischer Verschluss zur exakten Regelung der Bestrahlungsdauer), einem Standard-Interferenzfilter (Filter 1) mit einem schmalen Bereich um die Wellenlänge 365 nm, einer Sammellinse

sowie einem auf ca. 17 °C thermostatisierten Küvettenhalter bestand. Um die Überhitzung von Filter 1 zu verhindern, wurde ggf. zwischen Shutter und Filter 1 noch ein Breitbandfilter UG1 (Filter 2) installiert. Bei den Bestrahlungsversuchen wurde Licht der Wellenlänge 365 nm verwendet, damit nur die Schutzgruppen und nicht die heterocyclischen Basen angeregt werden. Die Bestrahlung erfolgte in Quarzküvetten (3,5 ml) mit je 3 ml Lösung (Ausgangskonzentration 0,1 bzw. 0,025 mmol/l). Nach erfolgter Bestrahlung wurden der Küvette zwei Proben entnommen und mit Hilfe eines HPLC-Systems analysiert.

Das HPLC-System der Fa. Merck-Hitachi bestand aus folgenden Geräten: Pumpe L-7100, Auto-Sampler L-7200, UV/VIS-Detektor (Detektionswellenlänge 260 nm) L-7420 und Interface D-7000. Als Säule wurde eine LICHROSORB RP 18 der Fa. Merck verwendet. Die Steuerung erfolgte mit einem Computer der Fa. Compaq durch den HSM-Manager.

Zur Chromatographie wurde der folgende Gradient (Lösemittel: Wasser und Acetonitril) verwendet (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

Gradient				
Zeit [min]	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O/MeCN (1:1) [%]	MeCN [%]	Fluß
0	100	0	0	1
3	100	0	0	1
10	0	100	0	1
25	0	0	100	1
30	0	100	0	1
33	100	0	0	1
38	100	0	0	1

In den erhaltenen Chromatogrammen konnten die Abnahme des Eduktes (5'-O-geschütztes Nucleosid) und die Zunahme des Produktes (5'-O-entschütztes Nucleosid) verfolgt werden. Die Auswertung erfolgte dabei über

die Fläche der einzelnen Peaks. Als Referenz wurde die Lösung des zu bestrahlenden Nucleosids zum Zeitpunkt 0 Min. (d. h. vor der Bestrahlung) eingespritzt und die Fläche des erhaltenen Peaks als 100 % Edukt angesehen. Gleichermaßen wurde für das Produkt verfahren: Es wurde die Peakfläche einer 0,1 bzw. 0,025 mmolaren Lösung bestimmt und als 100 % gesetzt. Die jeweiligen Flächen der Produkte und Edukte der anderen Zeitpunkte wurden auf diese Referenzwerte bezogen.

Aus den so erhaltenen Kurven (Konz. in % gegen die Zeit aufgetragen) wurden folgende Werte abgelesen:

$t_H$ : Halbwertszeit: der Zeitpunkt, an dem die Hälfte des Eduktes umgesetzt war

Konz.  $t_H$ : Konzentration des Produktes bei der Halbwertszeit

Konz.  $t_{end}$ : Konzentration des Produktes am letzten untersuchten Zeitpunkt.

Meistens wurde dieser Zeitpunkt so gelegt, daß das Edukt nicht mehr nachweisbar war.

Die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Wie man aus Tabelle 2 ersieht, variieren die Halbwertszeiten bei den verschiedenen Nucleosiden relativ stark. Während das 5'-O-Phenylpropylsulfonyl-thymidin-Derivat (Beispiel 15) mit 49 Sekunden die kürzeste Halbwertszeit aufweist, beträgt diese beim 5'-O-[2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-geschützten 2'-Desoxyadenosin (Beispiel 12) 42 Minuten.

Was die Ausbeuten der entschützten Nucleoside betrifft, so läßt Tabelle 2 erkennen, daß beim 5'-O-[2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-geschützten 2'-Desoxyadenosin (Beispiel 11) diese mit 97 % am höchsten liegt, während sie bei den anderen Nucleosid-Derivaten Werte zwischen ca. 50 und 85 % annimmt.

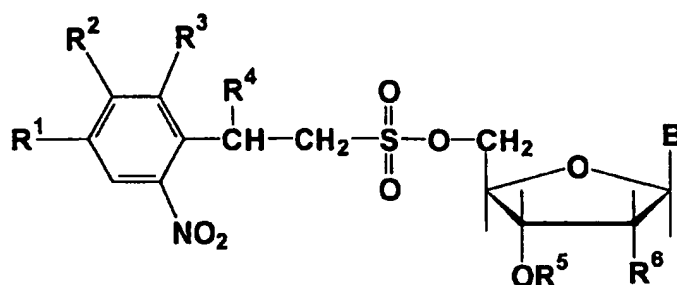
Tabelle 2: Bestrahlung der 5'-O-geschützten Nucleoside

Beispiel	Verbindung	t <sub>ir</sub>	Ausbeute an Nucleosiden		
			Konz. t <sub>ir</sub>	Konz. t <sub>end</sub>	(t <sub>end</sub> Konz. Edukt)
11	N <sup>6</sup> NPEOC-5'-O-[2-(2-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-2'-desoxyadenosin <sup>1)</sup>	21 Min	49 %	97 %	(120 Min, 3%)
12	5'-O-[2-(2-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N <sup>6</sup> -NPEOC-2'-desoxyadenosin <sup>1)</sup>	42 Min	38 %	68 %	(120 Min, 16%)
13	5'-O-[2-(4-Chlor-6-nitrophenyl)ethylsulfonyl]-N <sup>4</sup> -NPEOC-2'-desoxycytidin <sup>1)</sup>	15,8 Min.	32 %	71 %	(120 Min, 1%)
14	5'-O-[2-(2,4-Dinitrophenyl)ethylsulfonyl]-N <sup>2</sup> -NPEOC-O <sup>6</sup> -NPE-2'-desoxyguanosin <sup>2)</sup>	16,3 Min.	40 %	85 %	(120 Min, 0%)
15	5'-O-2-(2-Nitrophenyl)propylsulfonyl]-thymidin <sup>1)</sup>	49 Sek.	26 %	48 %	(600 Sek, 0%)

<sup>1)</sup> Konzentration: 0,1 mmol/l; Lösemittel: MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1<sup>2)</sup> Konzentration: 0,025 mmol/l; Lösemittel: MeOH/H<sub>2</sub>O 3:2

Patentansprüche

## 1. Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I)



in der

$R^1$  = H,  $\text{NO}_2$ , CN,  $\text{OCH}_3$ , Halogen oder Alkyl oder Alkoxyalkyl mit 1 bis 4 C-Atomen

$R^2$  = H,  $\text{OCH}_3$

$R^3$  = H, F, Cl, Br,  $\text{NO}_2$  oder ein aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 C-Atomen

$R^4$  = H, Halogen,  $\text{OCH}_3$ , ein Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein ggf. substituierter Arylrest

$R^5$  = H oder eine übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonucleotiden

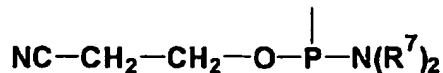
$R^6$  = H, OH, Halogen oder  $\text{XR}^8$ , wobei X = O oder S und  $R^8$  eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe darstellt

B = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-imidazolcarbonsäureamid-1-yl oder 5-Amino-4-imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von B = Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.

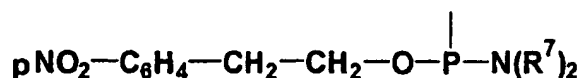
2. Nucleosid-Derivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von  $R^4 \neq \text{H}$   $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$  ist.

3. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^4$  einen Methylrest darstellt.

4. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^5$  eine Phosphitamidgruppe der Formel



oder



darstellt, wobei die  $R^7$ -Gruppen gleich oder verschieden sind und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten.

5. Nucleosid-Derivate nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^7$  einen Ethyl- oder Isopropylrest darstellt.

6. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß  $R^6$  eine Gruppe  $XR^8$  ist und  $R^8$  im Fall von  $X = O$  eine Alkyl-, Alkenyl-, Acetal- oder Silylether-Schutzgruppe oder im Fall von  $X = S$  eine Alkyl-Schutzgruppe darstellt.

7. Nucleosid-Derivate nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als  $R^6$  ein O-Methyl- oder O-Ethylrest, ein O-Allylrest, ein O-Tetrahydropyranyl- bzw. O-Methoxytetrahydropyranyl-Rest oder ein O-t-Butyldimethylsilyl-Rest eingesetzt wird.

8. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man im Falle von  $B = \text{Adenin, Cytosin oder Guanin}$  als permanente Schutzgruppe Phenoxyacetyl- oder Dimethylformamidino-Reste einsetzt.

9. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man im Falle von  $B = \text{Adenin}$  als permanente Schutzgruppe Benzoyl- oder p-Nitrophenylethoxycarbonyl-(p-NPEOC)-Reste verwendet.

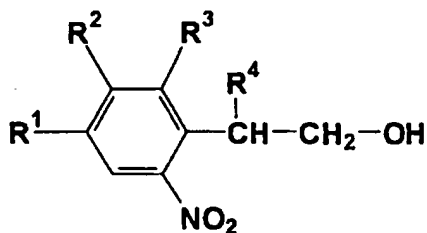
10. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von B = Guanin die permanente Schutzgruppe Isobutyryl-, p-Nitrophenylethyl-(p-NPE)- oder p-NPEOC-Reste darstellen.

11. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man im Falle von B = Cytosin als permanente Schutzgruppe Benzoyl- oder p-NPEOC-Reste einsetzt.

12. Nucleosid-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Halogenatom in R<sup>1</sup> oder R<sup>6</sup> ein Fluor-, Chlor- oder Bromatom eingesetzt wird.

13. Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-Derivaten nach den Ansprüchen 1 bis 12 in mindestens drei Stufen, dadurch gekennzeichnet, daß man

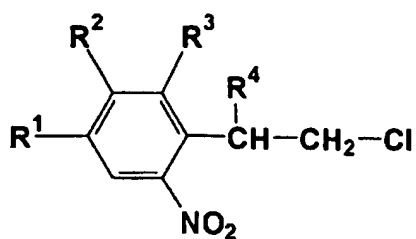
a) einen Alkohol der allgemeinen Formel (II)



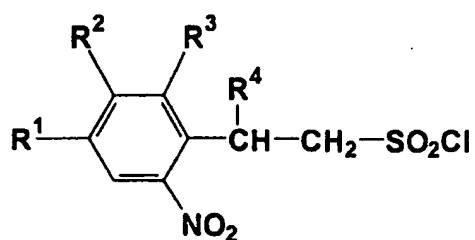
in der R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> die oben angegebene Bedeutung besitzen, mit Thionylchlorid umgesetzt und anschließend

b) das in Stufe a) gebildete Phenylalkylchlorid der allgemeinen Formel (III)



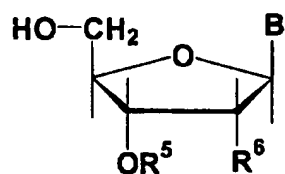


zuerst mit Natriumthiosulfat und anschließend mit Chlor zu einem Phenylalkylsulfonylchlorid der allgemeinen Formel (IV)



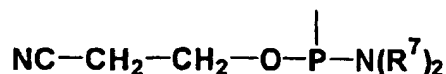
umwandelt und anschließend

c) das in Stufe b) gebildete Phenylalkylsulfonylchlorid mit Nucleosiden der allgemeinen Formel (V)

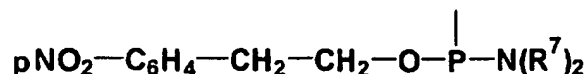


in der  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$  und  $\text{B}$  die oben angegebene Bedeutung besitzen, reagieren läßt und ggf. anschließend

d) in der 3'-Stellung der Nucleosid-Derivate mit  $\text{R}^5 = \text{H}$  die Phosphitamid-Gruppe



oder



nach bekannten Methoden einführt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man Stufe a) in einem unpolaren organischen Lösemittel bei Temperaturen zwischen 50 und 120 °C ggf. in Gegenwart einer Base durchführt.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe a) das Thionylchlorid in zwei- bis fünffachem Überschuß bezogen auf die Alkoholkomponente einsetzt.

16. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe a) als unpolares organisches Lösemittel Toluol verwendet.

17. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe a) als Base Pyridin einsetzt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man das Pyridin in einer Menge von 2 bis 10 Vol.-% bezogen auf das eingesetzte Toluol verwendet.

19. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Alkoholkomponente in Stufe a) 1,0 bis 20,0 mmol pro 10 ml Solvens beträgt.

20. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe b) die Umsetzung mit Natriumthiosulfat in einem Lösemittelgemisch bestehend aus einem Alkohol und Wasser bei Temperaturen zwischen 50 und 100 °C durchführt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkohol Methanol oder Ethanol heranzieht.
22. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe b) pro mmol Phenylalkylchlorid 1,5 bis 2,5 mmol Natriumthiosulfat verwendet.
23. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe b) die Chlorierung in Wasser, in einem Wasser/Essigsäure- oder Wasser/Dichlormethan-Gemisch bei Temperaturen zwischen 0 und +25 °C durchführt.
24. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Umsetzung gemäß Stufe c) in einem Lösemittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Pyridin bei Temperaturen zwischen -60 und 0 °C vornimmt.
25. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Molverhältnis Nucleosid zu Phenylalkylsulfonylchlorid 1 : 1 bis 1 : 2 beträgt.
26. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe c) das in Pyridin gelöste Nucleosid vorlegt und eine Lösung des Phenylalkylsulfonylchlorids in Dichlormethan bei der jeweiligen Reaktionstemperatur zutropfen läßt.
27. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Nucleosids im Lösemittelgemisch in Stufe c) 0,1 bis 3,0 mmol pro 10 ml Solvens beträgt.
28. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß man die Einführung der Phosphitamid-Gruppe (Stufe d) durch Umsetzung der Nucleosid-Derivate (mit  $R^5 = H$ ) mit den entsprechenden Phosphinen in Gegenwart von 1H-Tetrazol als Aktivator in einem Lösemittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Acetonitril bei Temperaturen zwischen 0 und 25 °C vornimmt.

29. Verwendung eines Nucleosid-Derivats der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1 für die lichtgesteuerte Synthese von Oligonucleotiden.

30. Verwendung gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese auf einem festen Trägermaterial erfolgt.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 97/02257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H21/00 C07H19/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 36 06 394 A (PFLEIDERER WOLFGANG PROF DR DR) 3 September 1987 see the whole document ---	1
A	DE 36 06 395 A (PFLEIDERER WOLFGANG PROF DR DR) 3 September 1987 see the whole document ---	1
A	H.SCHIRMEISTER ET AL.: "21.Nucleosides" HELVETICA CHIMICA ACTA., vol. 76, no. 1, 1993, BASEL CH, pages 385-401, XP002041322 see abstract --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 1997

Date of mailing of the international search report

03. 10. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 97/02257

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	E.UHLMANN ET AL.: "New Improvements in Oligonucleotide Synthesis by Use of the P-nitrophenylethyl Phosphate Blocking Group and its Deprotection by DBU or DBN." TETRAHEDRON LETTERS., vol. 21, no. 13, 1980, OXFORD GB, pages 1181-1184, XP002041323 see the whole document ---	1
A	PFLEIDERER W ET AL: "NEW PROTECTING GROUPS IN NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE CHEMISTRY" BIOPHOSPHATES AND THEIR ANALOGUES - SYNTHESIS, STRUCTURE, METABOLISM AND ACTIVITY, 1 January 1987, pages 133-142, XP000570661 cited in the application see the whole document ---	1
P,A	WO 96 18634 A (PFLEIDERER WOLFGANG ;GIEGRICH HEINER (DE)) 20 June 1996 see claim 1 -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/02257

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 3606394 A	03-09-87	NONE	
DE 3606395 A	03-09-87	NONE	
WO 9618634 A	20-06-96	DE 4444996 A	20-06-96
		AU 4386596 A	03-07-96
		NO 972754 A	11-08-97

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02257

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C07H21/00 C07H19/04		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07H		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 36 06 394 A (PFLEIDERER WOLFGANG PROF DR DR) 3.September 1987 siehe das ganze Dokument ---	1
A	DE 36 06 395 A (PFLEIDERER WOLFGANG PROF DR DR) 3.September 1987 siehe das ganze Dokument ---	1
A	H.SCHIRMEISTER ET AL.: "21.Nucleosides" HELVETICA CHIMICA ACTA., Bd. 76, Nr. 1, 1993, BASEL CH, Seiten 385-401, XP002041322 siehe Zusammenfassung ---	1
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  22.September 1997		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts  03.10.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Scott, J



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	E.UHLMANN ET AL.: "New Improvements in Oligonucleotide Synthesis by Use of the P-nitrophenylethyl Phosphate Blocking Group and its Deprotection by DBU or DBN." TETRAHEDRON LETTERS., Bd. 21, Nr. 13, 1980, OXFORD GB, Seiten 1181-1184, XP002041323 siehe das ganze Dokument ---	1
A	PFLEIDERER W ET AL: "NEW PROTECTING GROUPS IN NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE CHEMISTRY" BIOPHOSPHATES AND THEIR ANALOGUES - SYNTHESIS, STRUCTURE, METABOLISM AND ACTIVITY, 1.Januar 1987, Seiten 133-142, XP000570661 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
P,A	WO 96 18634 A (PFLEIDERER WOLFGANG ;GIEGRICH HEINER (DE)) 20.Juni 1996 siehe Anspruch 1 -----	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/02257

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 3606394 A	03-09-87	KEINE	
DE 3606395 A	03-09-87	KEINE	
WO 9618634 A	20-06-96	DE 4444996 A	20-06-96
		AU 4386596 A	03-07-96
		NO 972754 A	11-08-97